

EFEK ASAM METOKSIASETAT TERHADAP KON드로GENESIS JARI ANGGOTA TUBUH DEPAN MENCIT (*Mus musculus*) SWISS WEBSTER

Agus Haryono¹, Tien Wiati Surjono², Lien Alina Sutasurya², dan Sri Sudarwati²

¹Fakultas Keguruan Ilmu Pendidikan Universitas Palangkaraya
Kampus UNPAR Tunjung nyaho Jl. Yos Sudarso C 11 Palangka Raya
e-mail : h.suga@lycos.com

²Sekolah Tinggi Ilmu Hayati, Institut Teknologi Bandung
Jl. Ganesha 10 Bandung

ABSTRAK

Asam metoksiasetat (MAA) dapat mengakibatkan kelainan digit anggota tubuh depan mencit Swiss Webster (SW). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui gangguan kondrogenesis jari anggota tubuh depan akibat perlakuan dengan MAA. MAA diberikan secara *gavage* pada mencit SW umur kebuntingan 11 hari. Penentuan kondrogenesis dilakukan pada rigi jari III dan IV dengan mengamati sayatan plantar tunas anggota tubuh yang diwarnai Hematoksilin-Eosin. Komponen matriks ekstraseluler; asam hialuronat (AH) dan kondroitin sulfat (KS) diwarnai dengan *Alcian blue* 1%, sedangkan kolagen (KOL) ditentukan dari hasil pewarnaan Azan Heidenhain. Hasil penelitian menunjukkan, bahwa sel mesenkim di wilayah bakal rigi jari IV dan sekitarnya mengalami apoptosis. Sel mesenkim yang bermigrasi ke tempat kondensasi rigi jari IV jumlahnya menurun, sehingga diferensiasi sel mesenkim menjadi kondroblas terganggu, sintesis asam hialuronat AH sedikit, dan hanya meningkat ketika sel mesenkim terkondensasi. Demikian juga kehadiran KS terlambat dan kandungannya rendah, bahkan kolagen tidak ditemukan karena komponen sel yang menyusun rigi jari IV masih berupa kondroblas. Dengan demikian dapat disimpulkan, bahwa MAA mengganggu kondensasi mesenkim pada pembentukan rigi jari akibat jumlah sel yang berkurang, sehingga menghambat diferensiasi sel maupun sintesis komponen matriks ekstraseluler.

Kata kunci: Asam metoksiasetat, kondrogenesis, anggota tubuh mencit SW, matriks ekstraseluler

THE EFFECT OF METHOXYACETIC ACID ON THE DIGIT FORELIMB CHONDROGENESIS OF *Mus musculus* SWISS WEBSTER

ABSTRACT

Methoxyacetic acid (MAA) causes digit malformation of Swiss Webster forelimb if given orally on gestation day 11. The aim of this research is to find out the effect of MAA on digit forelimb chondrogenesis by cellular and extracellular matrix

components observation. MAA was administered by gavage at 11 gestation day of Swiss Webster mice. Observation on the chondrogenesis were done on digit III and IV from plantar sections of limb buds which were stained with Hematoxylin-Eosin. Extracellular matrix components; hyaluronic acid (AH) and chondroitin sulfate (KS) were determined using Alcian blue 1%, whereas collagen (KOL) was determined using Azan Heidenhain stain. The results showed that the number of mesenchymal cells, originated from the surrounding digital ray areas, which have to migrate to the digital ray IV and the mesenchymal cells at the site for digital ray IV were reduced by apoptosis. Consequently the formation of digital ray IV was delayed and further disturbed the mesenchymal cells to differentiate into chondroblasts, AH synthesis was decreased, but then increased at the mesenchymal cells condensation stage and afterwards decreased. The synthesis of KS was also delayed and reduced, KOL was not detected since the digital ray IV was still composed of chondroblasts. In summary, MAA disturbance of mesenchymal cells condensation at the beginning of digital ray formation. Furthermore, the reduction of cell number interferes the cell differentiation and also the synthesis of the extracellular matrix components of the digit.

Keywords: Methoxyacetic acid, chondrogenesis, Swiss Webster forelimb, extracellular matrix

PENDAHULUAN

Penggunaan dimethoxyethyl phthalate (DMEP) maupun 2-methoxyethanol (2-ME) di berbagai industri sebagai pelentur semakin luas (Miller *et al.*, 1983 ; *Canadian Environmental Protection Act* atau CEPA, 2000). DMEP maupun 2-ME dapat masuk ke dalam tubuh melalui kulit, pernafasan atau secara oral, kemudian menyebar di dalam tubuh dan juga dapat masuk ke dalam embrio (CEPA, 2000). Di dalam tubuh, baik DMEP maupun 2-ME, dimetabolisme menjadi asam metoksiasetat atau MAA (Ritter *et al.*, 1985 ; Aasmoe *et al.*, 1998; Kitagawa *et al.*, 2000). MAA merupakan senyawa yang bersifat teratogenik pada hewan percobaan. MAA dosis 10 mM/kg berat badan (bb) diberikan secara *gavage* pada mencit Swiss Webster (SW) umur kebuntingan (uk) 11 hari mengakibatkan 94,46% fetus mencit mengalami kelainan jari (Suripto *et al.*, 1995). Kelainan jari akibat MAA terjadi pada mencit CD-1 (Greene *et al.*, 1987) dan pada tikus (Sleet & Ross, 1987) dapat disebabkan oleh terganggunya kondrogenesis jari. Namun demikian, tahap mana dari kondrogenesis yang terganggu oleh MAA belum diketahui. Untuk mengetahui hal tersebut dilakukan penelitian efek MAA terhadap perubahan komponen sel selama kondrogenesis dan komponen matriks ekstrasel (ECM) yang terlibat dalam kondrogenesis jari anggota tubuh depan mencit SW.

BAHAN DAN METODE

Hewan yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit Swiss Webster. Induk hewan dipelihara di kandang hewan Sekolah Tinggi Ilmu Hayati ITB pada suhu ruang $27,2 \pm 0,6^{\circ}\text{C}$ dan kelembaban $84,9 \pm 10,3\%$ dengan periode terang 12 jam dan gelap 12 jam. Pakan berupa pelet (Charoen Pokphand 551) dan air minum diberikan berlebih. Hewan jantan yang digunakan berumur 12-14 minggu, sedangkan hewan betina berumur 10-12 minggu dengan berat badan berkisar antara 25-30 gram. Mencit dara yang sedang estrus dikawinkan dengan mencit jantan (1:1) pada sore hari. Bila pada keesokan harinya pada mencit betina terdapat sumbat vagina, maka mencit tersebut dinyatakan bunting nol hari (Taylor, 1986).

MAA (Wako Pure Chemical Industries Ltd) diencerkan dengan akuabides steril, dosis yang digunakan adalah 10 mM/kg bb dengan volume pemberian 0,1 mL/10g bb dan diberikan secara *gavage* pada umur kebuntingan 11 hari.

Untuk melihat pengaruh MAA terhadap kondrogenesis dilakukan pengamatan pada kondrogenesis jari III dan IV dan pola kehadiran dan sintesis ECM pada kondrogenesis jari.

Penentuan Kondrogenesis Jari III dan IV Akibat MAA.

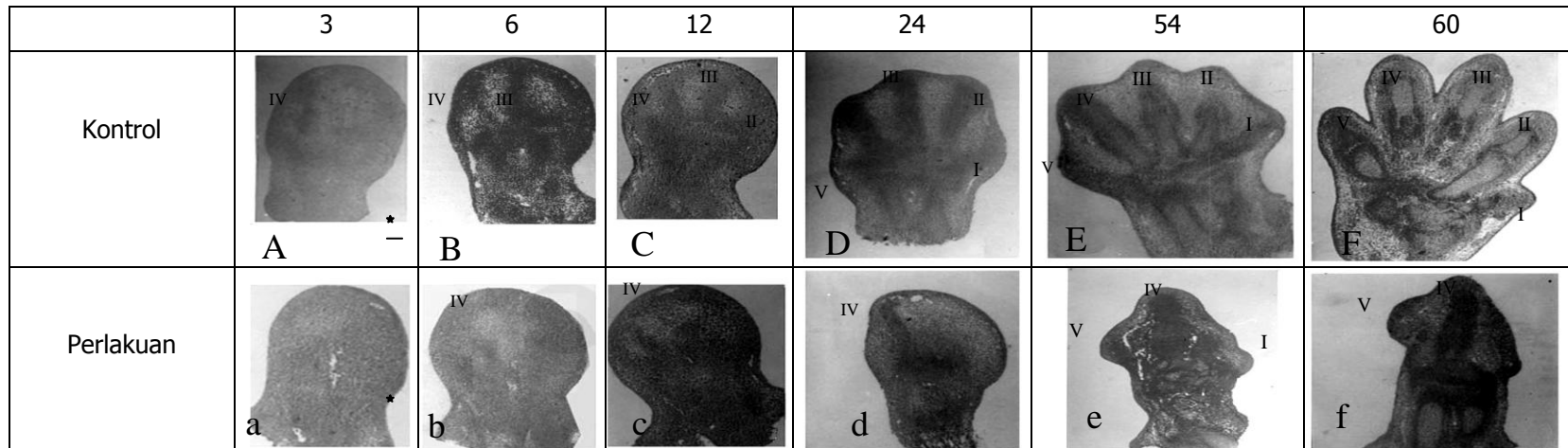
Kondrogenesis pada keping anggota tubuh depan fetus mencit SW diamati pada 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 18, 24, 48, 54, 60 jam setelah perlakuan. Keping anggota diisolasi, kemudian dibuat sayatan plantar, diwarnai dengan Hematoksilin-Eosin (Humason, 1967). Analisis kondrogenesis rigi jari III dan IV didasarkan pada pembentukan jaringan rawan secara umum (Junquiera *et al.*, 1977) mulai dari mesenkim, pembentukan rigi jari, proliferasi, diferensiasi kondroblas, dan diferensiasi kondrosit serta pembentukan matriks rawan.

Penentuan Pola Kehadiran dan Distribusi ECM pada Kondrogenesis Jari

Penentuan pola kehadiran dan distribusi komponen ECM pada keping anggota tubuh depan pada umur kebuntingan yang menunjukkan perubahan kondrogenesis jari III dan IV dengan menentukan pola kehadiran asam hialuronat (AH), kondroitin sulfat (KS) dan kolagen (KOL). Pewarnaan *Alcian blue* 1% pH 2,5 digunakan untuk mendeteksi asam hialuronat (AH), dan untuk deteksi kondroitin sulfat (KS) dengan *Alcian blue* 1% pH 1,0 (Fisher & Solursh, 1977). Deteksi KOL menggunakan pewarnaan Azan Heindehain (Humason, 1967).

HASIL

Perubahan selama kondrogenesis pada jari III dan IV, baik pada kontrol maupun perlakuan ditampilkan pada Tabel 1. Pada kelompok kontrol, rigi jari IV (Gb.1A) dibentuk lebih dahulu yaitu pada uk 11 hari+3 jam disusul oleh pembentukan rigi jari III (Gb.1B) pada uk 11 hari+6 jam dan jari yang lainnya.



Gambar 1. Perkembangan anggota tubuh depan mencit SW uk 11 hari+3, 6, 12, 24, 54, 60 jam (Sayatan plantar yang diwarnai dengan Hematoksilin-Eosin)

Kelompok kontrol

A. Rigi jari IV sudah terbentuk ; B. Rigi jari III sudah terbentuk; C. Rigi jari II sudah terbentuk; D. Keping anggota tubuh berbentuk pentagonal, dengan lima rigi jari ; E. Indentasi interdigital mulai tampak; F. Pelekukan interdigital lebih dalam dan terbentuk jari

Kelompok perlakuan dengan MAA

a. Mesoderm keping anggota tubuh masih mesenkim; b dan c . Rigi jari IV sudah terbentuk; d. Bentuk keping anggota terpancung di wilayah aksial dan preaksial, sebagian tempat rigi jari I, II dan III, sedangkan rigi jari IV tetap ada; e. Keping anggota berbentuk trigonal dengan rigi jari IV, serta sebagian bakal rigi jari I dan V masih tersisa ; f. Rigi jari IV lebih jelas dan tersisa tonjolan bakal rigi jari V

Sisi kanan (★) : Sisi preaksial ; Skala pada gambar A panjangnya 100 µm untuk seluruh Gambar (A,B,C,D,E,F, dan a,b,c,d,e,f)

Pada kelompok perlakuan, pembentukan rigi jari IV (Gb. 1b) mengalami kelambatan 3 jam dibandingkan dengan pembentukan rigi jari IV yang normal, sedangkan rigi jari III tidak terbentuk.

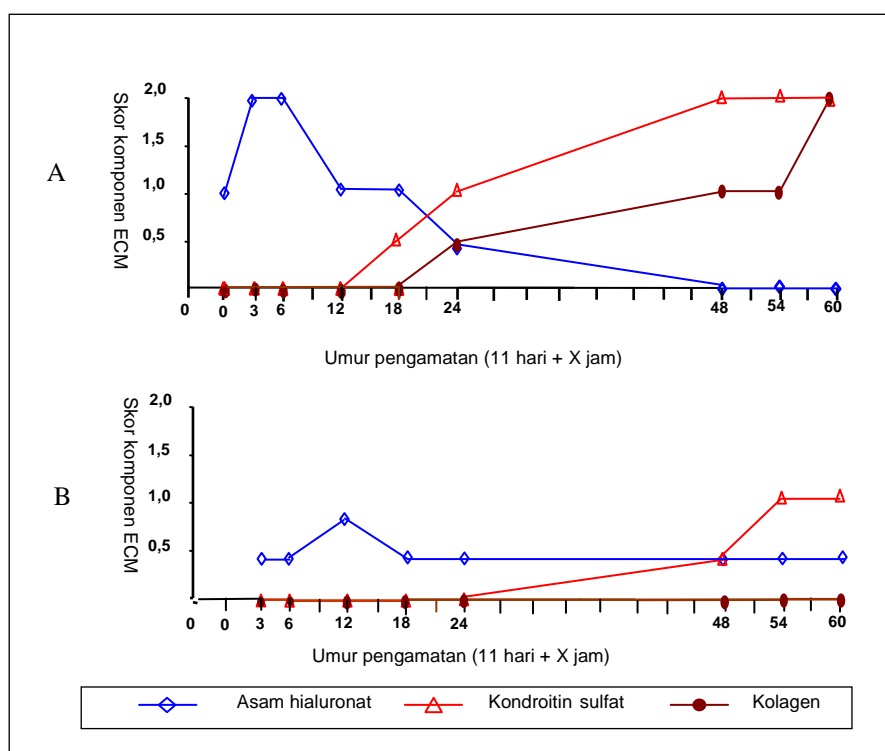
Tabel 1. Kondrogenesis jari yang diamati berdasarkan jenis sel, pembentukan rigi jari serta matriks rawan yang membangun bakal jari IV anggota tubuh depan mencit SW dari kelompok kontrol dan perlakuan dengan MAA pada umur kebuntingan 11 hari + 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 18, 24, 48, 54, dan 60 jam.

Perubahan selama kondrogenesis	Umur kebuntingan 11 hari + X jam			
	Kontrol		Perlakuan	
	III	IV	III	IV
Mesenkim	0-60	0-60	0-24	0-60
Awal kondensasi mesenkim (rigi jari)	6	3	-	6
Kondroblas	18-54	18-48	-	24-60
Kondrosit	54-60	48-60	-	60
Matriks rawan	54-60	48-60	-	60

Sejalan dengan proses pembentukan rawan atau kondrogenesis, komponen sel di pusat kondrogenesis rigi jari III maupun IV mengalami perubahan. Sampai uk 11 hari+60 jam perubahan komponen sel mulai dari mesenkim, diferensiasi sel mesenkim menjadi kondroblas dan akhirnya menjadi kondrosit dan pembentukan matriks rawan sudah dapat dideteksi (Tabel 1). Dari Tabel 1 terlihat, bahwa pembentukan matriks rawan di pusat kondrogenesis jari IV mulai terdeteksi pada uk 11 hari+48 jam dengan komponen selnya kondroblas dan sedikit kondrosit, sedang di pusat kondrogenesis jari III pada uk 11 hari+54 jam dengan komponen sel seperti pada jari IV. Pada uk 11+60 jam, baik di pusat kondrogenesis jari III dan IV, komponen selnya adalah kondrosit. Pada kelompok perlakuan jari yang mampu berkembang dan di pusat kondrogenesisnya dengan membentuk matriks rawan hanya terjadi pada rigi jari IV yaitu pada uk 11 hari+60 jam dengan ukuran jari yang lebih kecil dari kontrolnya (Gb 1f). Rigi jari III sampai uk 11 hari+24 jam (Gb. 1d) tidak terbentuk dan komponen sel yang membangunnya masih tetap mesenkim (Tabel 1). Pada uk 11 hari+60 jam, wilayah bakal rigi jari I, II, dan III sudah menghilang dan hanya tersisa rigi jari IV dengan sebagian wilayah rigi jari V (Gb.1f).

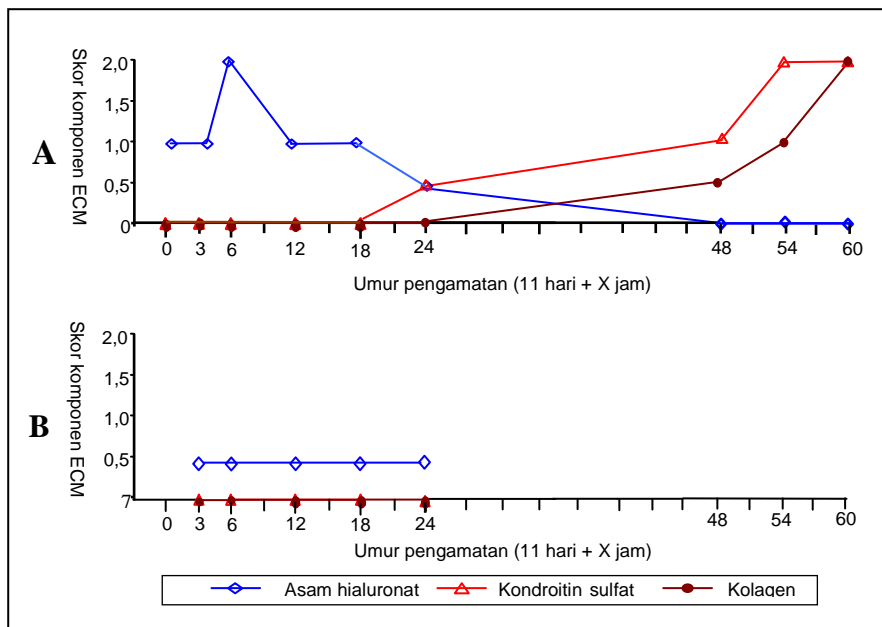
Hasil pengamatan pola kehadiran dan kandungan komponen ECM yang berperan dalam kondrogenesis ditampilkan pada Gambar 2 dan Gambar 3. Pada kelompok kontrol, kehadiran AH, KS dan Kol di pusat kondrogenesis, baik pada rigi jari III maupun IV terdeteksi sejalan dengan perubahan komponen sel di pusat kondrogenesis. AH ditemukan dengan kandungan yang meningkat ketika terjadi pembentukan rigi jari dan mencapai puncak pada uk 11 hari+3-6 jam (Gb. 2A) di wilayah bakal jari IV sedang di wilayah bakal jari III kandungan AH mencapai puncak pada uk 11 hari+6 jam (Gb. 3A). Kehadiran KS di pusat kondrogenesis jari

IV ditemukan diantara sel-sel kondroblas pada uk 11 hari+18 jam sedang di jari III ditemukan pada uk 11 hari+24 jam. Kol di pusat kondrogenesis jari IV ditemukan diantara kondroblas dan kondrosit atau diantara kondrosit dengan kandungan yang sedikit pada uk 11 hari+24 jam, sedang pada jari III mulai ditemukan pada uk 11 hari+48 jam. Pada kedua jari, kandungan kol mencapai puncak pada uk 11 hari+60 jam. Pada kelompok perlakuan, AH di pusat kondrogenesis jari IV mulai meningkat kandungannya ketika rigi jari mulai terbentuk yaitu mencapai puncak pada uk 11 hari+12 jam, sedang kandungan KS meningkat pada uk 11 hari+48 jam (Gb. 2B), yaitu ketika mulai ditemukan sel-sel kondroblas. Kandungan AH dan KS pada kelompok perlakuan terdeteksi lebih sedikit dibandingkan dengan kontrol. Kolagen pada di pusat kondrogenesis jari IV sampai umur kebuntingan 11 hari+60 jam tidak ditemukan (Gb. 2B). Pada wilayah bakal rigi III, komponen ECM yang ditemukan hanya AH dengan kandungan yang sangat sedikit (Gb. 3B).



Gambar 2. Pola kandungan asam hialuronat, kondroitin sulfat dan kolagen pada rigi jari IV anggota tubuh mencit kelompok kontrol (A) dan perlakuan dengan MAA (B)

Skor komponen ECM : 0 : tidak ada (-) ; 0,5 : sangat sedikit (\pm) ; 1 : sedikit (+) ; 2 : banyak (++)



Gambar 3. Pola kandungan asam hialuronat, kondroitin sulfat dan kolagen pada rigi jari III anggota tubuh mencit kelompok kontrol (A) dan perlakuan dengan MAA (B)

Skor komponen ECM : 0 : tidak ada (-) ; 0,5 : sangat sedikit (\pm) ; 1 : sedikit (+) ; 2 : banyak (++)

PEMBAHASAN

Pembentukan kelima rigi jari pada mencit SW tidak terjadi secara bersamaan. Rigi jari IV dibentuk lebih awal kemudian disusul oleh rigi jari lainnya (Gb.1) yang secara keseluruhan urutan pembentukan rigi jari dari penelitian ini seperti yang ditemukan oleh Wanek *et al.* (1989). Pada dasarnya kondrogenesis pada kelima jari berlangsung melalui urutan proses yang sama yaitu sel mesenkim berproliferasi, bermigrasi, berkondensasi, kemudian berdiferensiasi menjadi kondroblas dan akhirnya menjadi kondrosit. Pada setiap perubahan selama kondrogenesis tersebut berperan komponen ECM tertentu.

Pada pembentukan rigi jari, migrasi sel dari wilayah sekeliling bakal rigi jari terarah ke tempat pembentukan rigi jari, sehingga terbentuk kondensasi sel mesenkim. Pada waktu terjadi kondensasi sel mesenkim, kandungan AH meningkat (Gb.2A dan 3A). Menurut Maleski & Knudson (1996), peningkatan AH ketika sel mesenkim berkondensasi diperlukan untuk mempertahankan kondensasi tersebut.

Setelah terjadi kondensasi sel mesenkim di pusat kondrogenesis, sel mesenkim berdiferensiasi menjadi kondroblas dan kondroitin sulfat (KS) mulai

terdeteksi. Kandungan KS di wilayah tersebut semakin meningkat sejalan dengan bertambah banyaknya sel mesenkim yang berdiferensiasi menjadi kondroblas dan akibatnya kandungan AH menurun (Gb.2A dan 3A). Menurut Wroblewski *et al.* (1997) di dalam matriks rawan terdapat ECM yang khas yaitu KS dan Kol II, sedang pada penelitian ini KS sudah terdeteksi sebelum matriks rawan terbentuk, yaitu ketika komponen sel yang menyusun rigi jari masih berupa kondroblas.

Di pusat kondrogenesis terjadi diferensiasi kondroblas menjadi kondrosit dan terbentuk matriks rawan. Selain KS di matriks rawan terdeteksi pula Kol. Menurut Dessau *et al.* (1980); Price *et al.* (1991) dan Shakibaei & Souza (1997), diferensiasi kondroblas menjadi kondrosit akan terjadi pergantian kolagen I dengan kolagen II dan kolagen II merupakan ciri spesifik untuk menunjukkan keberadaan kondrosit. Pada penelitian ini KOL yang terdeteksi dengan pewarnaan Azan Heidenhain pada matriks rawan, diduga adalah kolagen II.

Pada penelitian ini rigi jari IV merupakan rigi jari yang masih dapat terbentuk walaupun terlambat yaitu terdeteksi pada 6 jam setelah perlakuan. Kelambatan pembentukan rigi jari tersebut disebabkan oleh menurunnya jumlah sel mesenkim karena apoptosis. Pada 5 jam setelah perlakuan di wilayah sekeliling bakal rigi jari IV sudah mengalami apoptosis, sehingga sel mesenkim yang seharusnya bermigrasi ke tempat bakal rigi jari IV jumlahnya berkurang. Selain itu pada umur kebuntingan tersebut, sel mesenkim di wilayah bakal rigi jari IV juga mengalami apoptosis, sehingga sel mesenkim di wilayah bakal rigi jari IV juga berkurang. Meskipun demikian sel mesenkim di wilayah bakal rigi jari IV masih terdapat sel-sel mesenkim yang dapat berproliferasi menggantikan sel-sel yang mengalami apoptosis, sehingga sel mesenkim masih dapat membentuk kondensasi untuk rigi jari IV. Karena jumlah sel yang membentuk rigi jari IV sedikit dan komponen ECM yang diperlukan untuk migrasi sel juga sedikit menyebabkan pembentukan rigi jari IV mengalami kelambatan dan ukurannya kecil. Hal itu sejalan dengan komponen ECM yang terdeteksi adalah AH dan KS yang lebih lambat dibandingkan kontrol, sehingga dari penelitian ini diketahui sampai uk 11 hari+60 jam, diferensiasi sel rigi jari IV baru mencapai kondroblas dan belum terbentuk kondrosit.

Dengan demikian dapat disimpulkan, bahwa MAA mengganggu kondensasi mesenkim pada pembentukan rigi jari akibat jumlah sel yang berkurang, sehingga menghambat diferensiasi sel maupun sintesis komponen matriks ekstrasel rigi jari.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan, bahwa MAA mengganggu kondrogenesis pada tahap pembentukan rigi jari diakibatkan oleh kejadian kematian sel apoptosis yang terus meningkat di wilayah bakal rigi jari, sehingga rigi jari tidak terbentuk. Bila terbentuk akan terjadi jari yang tidak berkembang karena jumlah sel mesenkim yang harus membentuk kondensasi mesenkim pada pembentukan rigi jari hanya sedikit, sehingga menghambat diferensiasi sel maupun sintesis komponen ECM rigi jari.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih disampaikan kepada *Asahi Glass Foundation* yang telah memberikan dana penelitian untuk anggaran tahun 1999-2001, juga kepada Lembaga Penelitian Institut Teknologi Bandung yang telah memberikan kesempatan untuk mendapatkan dana dari *Asahi Glass Foundation*.

DAFTAR PUSTAKA

- Aasmoe, L., Winberg, J.O. & Aarbakke, J. (1998). The role of liver alcohol dehydrogenase isoenzymes in the oxidation of glycolethers in male and female rat, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 150 (1), 86–90 .
- CEPA (Canadian Environmental Protection Act) (2000). Priority substances list assessment report: 2-methoxyethanol. Canada.
- Dessau, W., von de Mark, H., von de Mark, K & Fischer, S. (1980). Change in patterns of collagens and fibronectin during limb bud chondrogenesis, *J. Embryol. Exp. Morph.*, 57, 51–60.
- Fisher, M & Solursh, M. (1977). Glycosaminoglycan localization and role in maintenance of tissue spaces in the early chick embryo. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 42, 195-207.
- Greene, J.A., Sleet, R.B., Morgan, K.T., & Welsch, F. (1987) Cytotoxic effect of ethylene glycol monoethyl ether in the forelimb bud of the mouse embryo, *Teratology*, 3, 23–34.
- Humason, G.L. (1967). *Animal tissue techniques* (pp. 163 – 164). USA. 2nd Ed. W. H. Freeman & Company.
- Junqueira, L.C., Carneiro, J, & Contopoulos, A.N. (1977). *Basic histology* Japan. pp.111 – 126. Lange Medical Publications, Maruzen Company.
- Kitagawa, K., Kawamoto, T., Kunugita, N., Tsukiyama, T., Okamoto, K., Yoshida, A & Nakayama, K. (2000). Aldehyde dehydrogenase (ALDH) 2 Associates with oxidation of methoxyacetaldehyde ; in vitro analysis with liver subcellular fraction derived from human and Aldh2 gene targeting mouse, *Fed. Euro. Biochem. Soc.*, 476, 306–311.
- Maleski, M.P. & Knudson, C.B. (1996). Hyaluronan-mediated aggregation of limb bud mesenchyme and mesenchyme condensation during chondrogenesis, *Exp. Cell. Res.* 225, 55–66.
- Miller, R.R., Hermann, E.A., Langvardt, P.W., McKenna, M.J. & Schwetz, B.A. (1983). Comparative metabolism and disposition of ethylene glycol monoethyl ether in male rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 67, 229–237.

- Price, J.S., Oyajobi, B.O. & Russell, R.G.G. (1991). The cell biology of bone growth. <http://www.med.edu/bone.com> (Mei, 2004).
- Ritter, E.J., Scott, W.J., Randall, J.L. & Ritter, J.M. (1985) Teratogenicity of dimethoxyethyl phthalate and its metabolites 2-methoxyethanol and methoxyacetic acid in the rat. *Teratology*, 32, 25–30.
- Shakibaei, M. & Souza, P. (1997). Differentiation of mesenchymal limb bud cells to chondrocytes in alginate beads. *Cell. Biol. Int.*, 21, 75–86.
- Sleet, R.B. & Ross, W.P. (1987). Serine enhanced restoration of 2-methoxyethanol induced dysmorphogenesis in the rat embryo and near-term fetus. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 145, 415-424 .
- Suripto, Sjamrizal, Surjono, T.W. & Kamal, A. (1995). Pengaruh asam metoksiasetat terhadap kandungan DNA pada anggota badan embrio mencit (*Mus musculus*) Swiss Webster, Laporan Penelitian OPF-ITB No.1676096 1995/1996.
- Taylor, P. (1986). *Practical teratology*. London. Academic Press, Inc. London, Ltd
- Wanek, N., Muneoka, K., Holler-Dinsmore, G., Burton, R & Bryant, S.V. (1989). A staging system for mouse limb development. *Exp. Zool.*, 249, 41–49.
- Wroblewski, J., Engstrom, M., Edwall, C.A., Sjoborg, G., Sejersen, T., & Lendahl, U. (1997). Distribution of nestin in the developing mouse limb bud *in vivo* and in micro-mass cultures of cells isolated from limb buds. *Differentiation*, 61, 151–159.